

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Januar 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/06320 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/415

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08199

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Juli 2001 (16.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 34 320.1 14. Juli 2000 (14.07.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE [DE/DE]; Weinberg 3, 06120 Halle/Saale (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MILKOWSKI, Carsten [DE/DE]; Lafontaine-strasse 12, 06114 Halle (Saale) (DE). BAUMERT, Alfred [DE/DE]; Blumenstrasse 6, 06108 Halle (Saale) (DE). STRACK, Dieter [DE/DE]; Cranachstrasse 34, 38300 Wolfenbüttel (DE).

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INFLUENCING THE CONTENT OF SINAPINE IN TRANSGENIC PLANT CELLS AND PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEEINFLUSSUNG DES SINAPINGEHALTS IN TRANSGENEN PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for influencing the content of sinapine in transgenic plant cells and plants. The invention in particular relates to the inhibition of the enzymatic activity of a UDP-glucose: sinapoyl glucose transferase (SGT) in transgenic plant cells. The invention further relates to nucleic acid molecules containing a DNA sequence which codes for a protein with the enzymatic activity of an SGT. The invention furthermore relates to transgenic plants and plant cells, comprising the above nucleic acid molecules, as a result of which the above contain a reduced sinapine content in comparison with wild type plants or cells and the agricultural products and propagating material of the transgenic plants.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung des Sinapingehalts in transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Inhibierung der enzymatischen Aktivität einer UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyl-transferase (SGT) in transgenen Pflanzenzellen. Des weiteren betrifft die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten und aufgrund dessen im Vergleich zu Wildtyppflanzen bzw. -zellen einen verringerten Gehalt an Sinapin aufweisen, sowie Ernteprodukte und Vermehrungs-material der transgenen Pflanzen.



WO 02/06320 A2

Verfahren zur Beeinflussung des Sinapingehalts in transgenen Pflanzenzellen
und Pflanzen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung des Sinapingehalts in transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Inhibierung der enzymatischen Aktivität einer UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) in transgenen Pflanzenzellen. Des weiteren betrifft die Erfindung

10 Nukleinsäuremoleküle, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten und aufgrund dessen im Vergleich zu Wildtyppflanzen bzw. -zellen einen verringerten Gehalt an Sinapin aufweisen, sowie Ernteprodukte und Vermehrungs-

15 material der transgenen Pflanzen.

In den letzten 15 Jahren hat sich die Produktion pflanzlicher Öle weltweit stark erhöht. Der Anteil an Rapsöl wuchs dabei stärker als der anderer Ölsorten. Raps wird hauptsächlich zur Gewinnung hochwertiger Öle für die Lebensmittelindustrie ange-

20 baut. Das gewonnene Rapsöl wird aber auch zunehmend in anderen Industriezweigen eingesetzt. Außerdem ist die Verwendung von Rapsölen als nachwachsender Rohstoff zum Ersatz der begrenzten Ressourcen an fossiler Energie von wachsendem Interesse.

25 Als Rückstand der Ölgewinnung fallen große Mengen Rapsschrot bzw. Rapsmehl an, das als wertvolles proteinreiches Futtermittel Verwendung findet. So wird es in begrenztem Umfang in der Tierernährung eingesetzt. Rapsmehl hat einen mit Sojamehl vergleichbaren Proteingehalt von etwa 20% im Samen. Auch der Anteil an essentiellen Aminosäuren entspricht etwa dem des Sojamehls, so dass Rapsprotein

30 ernährungsphysiologisch mit dem Sojaprotein vergleichbar ist. Es besteht somit ein großes Interesse, das Rapsprotein auch für die menschliche Ernährung zugänglich zu machen.

- 2 -

Der Einsatz von Rapsmehl in der Tierernährung und die Verwendung von Rapsproteinen in der menschlichen Ernährung ist jedoch durch einen hohen Anteil an antinutritiven Komponenten eingeschränkt. Glucosinolate (D.W. Griffiths, J. Hortie (1998) Sci. & Biotechnol. 73: 1-18), die zunächst als wichtigste limitierende antinutritive Faktoren angesehen wurden, sind durch die Einführung von neuen Rapsorten, wie beispielsweise Canola, weitgehend reduziert worden und können durch züchterische Bearbeitung ganz eliminiert werden.

Eine andere wichtige Stoffgruppe mit antinutritiven Eigenschaften sind phenolische Inhaltsstoffe (A. Bouchereau et al. (1991), Phytochemistry 30:1873-1881). Der Gehalt an Phenolen in Rapsmehl liegt etwa dreißigmal so hoch wie in Sojamehl. Phenolische Verbindungen sind an der dunklen Farbe, dem bitteren Geschmack und einem unangenehmen Geruch sowie der adstringierenden Eigenschaften des Rapsmehls beteiligt (R. Blair und D. R. Reichert (1984), J. Sci. Food Agric. 35: 29-35). Lösliche phenolische Verbindungen werden im Rapssamen hauptsächlich in den Kotyledonen der Embryonen akkumuliert. Herausragende Komponente ist das Sinapoylcholin (Sinapin), dessen Gehalt im Rapsmehl bei 1 bis 2 % liegt.

Sinapin wird auch in Verbindung gebracht mit dem Auftreten von Fischgeruch in Eiern von Legehennen nach der Fütterung mit Rapssamen. Dieser Geruch ist auf die Akkumulation von Triethylamin in den Eiern zurückzuführen (R. G. Fenwick et al. (1984), J. Sci. Food Agric. 35: 757-761). Es wird postuliert, dass Rapssamen-Tannine die Triethylaminoxidase in Hühnern durch Komplexbildung hemmen und die Bildung des geruchlosen Triethylaminoxids verhindern.

Wie bereits vorstehend erwähnt, ist ein typisches Merkmal vieler Brassicaceen (*Cruciferae*) die Akkumulation von phenolischen Cholinestern in den Kotyledonen der Samen-Embryonen. Sinapoylcholin (Sinapin) ist mit 1 bis 2 % der Trockenmasse der Samen der herausragende Vertreter dieser Stoffklasse (K. Krygier et al. (1982), J. Food Chem. 30: 661-663); A. Bouchereau et al., vide supra). Andere Hydroxyzim-

- 3 -

säureester sind nur in geringen Mengen vorhanden (T. W. Fenton et al. (1980), J. Food Sci. 45: 1703-1705). Die biochemischen Mechanismen, die der Speicherung des Sinapins in den Samen zugrundeliegen, sind bislang noch wenig untersucht. Es gilt jedoch als sicher, dass die vegetativen Pflanzenteile nicht als Quelle für die Sinapinsäure der Samen in Frage kommen, da sie dort nicht nachweisbar sind. So haben Bopp und Luedicke (Z. Naturforsch. 1980, 35c: 539-543) gezeigt, dass nach Fütterung von ^{14}C -Phenylalanin an unreife Senf-Embryonen radioaktives ^{14}C in Sinapin eingebaut wird. Daraus kann geschlossen werden, dass alle Enzyme der Hydroxyzimtsäure-Biosynthese von der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) bis zur Sinapinsynthese in den Samen-Embryonen aktiv sind.

Auch der Katabolismus des Sinapins während der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung ist für Vertreter der Brassicaceen gut untersucht worden (A. Tzagoloff (1963), Plant. Physiol. 38: 202-206; M. Bopp und W. Luedicke (1975), Z. Naturforsch. 30c: 663-667; D. Strack (1977), Z. Pflanzenphysiol. 84: 139-145). Sinapin wird in keimenden Samen durch eine Sinapinesterase (G. Nurmman und D. Strack (1979), Z. Naturforsch. 34c: 715-720; D. Strack et al. (1980), Z. Naturforsch. 35c : 963-966) hydrolysiert und dient als Cholinquelle für die Membranlipide der jungen Keimpflanzen (D. Strack (1981), Z. Naturforsch. 36c: 215-221). Die Sinapinsäure wird über Sinapoylglucose als Intermediat in Sinapoylmalat überführt (D. Strack (1977)).

Ob Sinapin eine essentielle Bedeutung als Reservestoff besitzt, ist noch nicht völlig geklärt. Chapple et al. (1992, The Plant Cell 4 : 1413-1424) untersuchten Arabidopsis-Mutanten mit stark reduziertem Sinapingehalt (5% des Wildtyps). Diese Mutanten akkumulierten vorwiegend freies Cholin anstelle des Cholinesters. Die Keimungsrate und das Wachstum der Mutanten war mit dem Wildtyp vergleichbar. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Sinapin kein essentieller Bestandteil des Samens für die Samenkeimung bzw. Keimlingsentwicklung ist.

- 4 -

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist somit die Bereitstellung von transgenen Pflanzen, die einen im Vergleich mit ihrer Wildtypform verringerten Gehalt an Sinapin aufweisen und damit zur Proteingewinnung für Ernährungszwecke besser geeignet sind.

5

Die Entwicklung von Rapssorten mit niedrigem Sinapingehalt durch klassische Züchtungsprogramme war bislang wenig erfolgreich. Obwohl die verfügbaren Sorten teilweise deutliche Unterschiede in dem Gehalt an phenolischen Sekundärstoffe und in der Sinapinkonzentration zeigten, ist eine Selektion auf niedrigen Sinapingehalt
10 sehr zeitaufwendig und wenig reproduzierbar.

Deswegen ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den Sinapingehalt in Pflanzen durch genetische Unterdrückung von Enzymaktivitäten des Sinapin-Biosyntheseweges zu vermindern.

15

Ausgehend von der Sinapinsäure, die in den unreifen Samen aus dem Hydroxyzimtsäure-Biosyntheseweg angeliefert wird, werden für die Sinapinbildung zwei Enzyme benötigt, nämlich die UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) (Nurmann und Strack (1981), supra) und die Sinapoylglucose:Cholin-
20 Sinapoyltransferase (Sinapinsynthase; SCT) (Strack et al., (1983), supra):

SGT: Sinapinsäure + UDP-Glucose → Sinapoylglucose + UDP.

SCT: Sinapoylglucose + Cholin → Sinapin + Glucose.

25

Somit ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die endogene SGT-Aktivität in transgenen Pflanzen, insbesondere in transgenen Ölsaaten und besonders bevorzugt in transgenen Rapspflanzen zu reduzieren oder vollständig zu blockieren.

- 5 -

Die für eine SGT oder SCT kodierenden Gensequenzen sind nicht bekannt. Die SCT konnte in Samen von 44 Vertretern der Brassicaceen nachgewiesen und eine Korrelation zwischen SCT-Aktivität und Sinapingehalt gezeigt werden (J. Regenbrecht und D. Strack (1985), *Phytochemistry* 24: 407-410). Die Reinigung der SGT aus *Brassica napus*-Keimlingen wurde kürzlich von Wang und Ellis (*Phytochemistry* (1998) 49: 307-318) beschrieben. Ferner wurde eine Teilreinigung dieses Enzyms beschrieben (H.-P. Mock und D. Strack (1993), *Phytochemistry* 92: 575-579). Jedoch sind weder von der SCT noch von der SGT bislang brauchbare Sequenzdaten ermittelt worden.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit ferner die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Beeinflussung des Sinapingehalts in Pflanzen sowie rekombinante DNA-Moleküle zur Verfügung zu stellen, die eine DNA-Sequenz enthalten, die zur Manipulation des Sinapingehalts eingesetzt werden kann. Die vorstehend genannten und weitere Aufgaben der Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

15

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird jetzt erstmals eine DNA-Sequenz offenbart, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert.

20

Vorzugsweise stammt die Sequenz aus *Brassica*, besonders bevorzugt aus *Brassica napus*.

Durch Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kann die SGT beispielsweise durch Übertragung von Antisense- oder Sense- bzw. Cosuppressionskonstrukten der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen wirksam gehemmt werden und somit die Produktion von Sinapin im Samen unterbrochen werden. Des weiteren eignet sich für die Suppression der SGT-Aktivität in transgenen Pflanzen besonders die "double strength RNA interference"-Technik, auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS). Im Unterschied zur klassischen "antisense"-

25

30

Technik basiert die double strength RNA interference"-Methode auf der Bildung

eines stabilen RNA-Doppelstranges des zu supprimierenden Gens in der Pflanzenzelle und führt zu einer im Vergleich zur normalen "antisense"-Technik mindestens genauso effizienten Suppression des spezifischen Targetgens. Für optimale Doppelstrangbildung wird empfohlen, zwischen sense- und antisense-Fragment ein Intron einzubauen.

Die Beobachtung, dass der Sinapingehalt durch die Inhibierung der SGT wirksam vermindert werden kann, lässt sich in idealer Weise für die Erzeugung sinapinarmer bzw. -freier Pflanzentransformanten einsetzen, die zur Proteingewinnung für Ernährungszwecke geeignet sind. Grundvoraussetzung für die Erzeugung solcher Nutzpflanzen ist die Verfügbarkeit geeigneter Transformationssysteme. Hier wurde während der letzten zwei Jahrzehnte ein breites Spektrum an Transformationsmethoden entwickelt und etabliert. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen, die Einbringung von DNA mittels biologistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten.

Neben der Bereitstellung der erfindungsgemäßen SGT-DNA-Sequenzen kann der Fachmann weitere SGT kodierende DNA-Sequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann beispielsweise geeignete Hybridisierungssonden von den erfindungsgemäßen SGT-Sequenzen ableiten und für das Screening von cDNA- und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues SGT-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen, die in jedem bio- oder gentechnologischen Labor wohl bekannt und etabliert sind (s. beispielsweise Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbour

Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York). Der Fachmann kann natürlich auch anhand der erfindungsgemäßen Sequenzen geeignete Oligonukleotidprimer für PCR-Amplifikationen von SGT-Sequenzen synthetisieren und einsetzen.

- 5 Bei einer wesentlichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt die erfindungsgemäße, eine SGT kodierende DNA-Sequenz in der Antisense-Orientierung vor. Mit Hilfe der Antisense-Technik kann das endogene SGT-Gen bzw. -Gene gezielt inaktiviert werden, indem die erfindungsgemäße DNA-Sequenz „verkehrt“ herum, also in Antisense-Orientierung in einen Vektor ligiert wird. Die RNA, die bei
- 10 der Transkription eines derartigen Antisense-Gens entsteht, ist komplementär zur RNA des normalen Gens und kann die Synthese des SGT-Proteinprodukts verhindern, indem es zur Hybridisierung zwischen der nativen und der Antisense-RNA kommt.
- 15 Alternativ kann die endogene SGT-Expression durch ein Cosuppressionskonstrukt des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls gehemmt werden. Bei der Cosuppression wird ein voraktives Gen durch zusätzlich eingeführte, identische Kopien dieses Gens inaktiviert. Diese Inaktivierung ist vermutlich auf einen RNA-abhängigen Mechanismus zurückzuführen, an dem die RNA-dirigierte RNA-Polymerase
- 20 beteiligt ist.

Wie oben erwähnt, besteht ein weiterer bevorzugter Suppressionsansatz in der Anwendung der PTGS-Methode, die auf der Bildung eines stabilen RNA-Doppelstranges des zu supprimierenden Gens, also des endogenen SGT-Gens in der

25 Pflanzenzelle basiert.

Für den Fachmann ist klar, dass für das Erreichen eines Suppressionseffekts, der in einer Inhibierung der endogenen SGT-Aktivität resultiert, nicht zwingend die vollständige für SGT kodierende DNA-Sequenz eingesetzt werden muss. Die Erfindung

30 betrifft somit auch Fragmente der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, deren Ver-

wendung innerhalb eines Antisense-, Sense- oder PTGS-Konstrukts in einer verringerten Aktivität des Ziel-SGT-Enzyms resultiert. Man könnte solche Fragmente im Zusammenhang mit dieser Erfindung auch als „Antisense-, Suppressions- oder PTGS-aktive“ DNA-Fragmente bezeichnen, d.h. ihre Übertragung in Form eines
5 geeigneten Konstrukts bewirkt eine Reduktion der endogenen SGT-Enzymaktivität.

Dem Fachmann ist es mittels üblicher Techniken auf einfache Weise durch Übertragung verschiedener Fragmente möglich, festzustellen, welche Länge bzw. welche Teilbereiche der vollständigen SGT-kodierenden Sequenz das Fragment aufweisen
10 muss, um für die Inhibierung der endogenen Enzymaktivität geeignet zu sein.

Weiter bedarf es zur Ausführung der vorliegenden Erfindung lediglich geeigneter regulatorischer Sequenzen, die die Transkription einer operativ verknüpften SGT-DNA-Sequenz in den Samen der transformierten Pflanzen steuern. Auch hier kann
15 der Fachmann geeignete Sequenzen problemlos dem Stand der Technik entnehmen oder selbst samenspezifische Promotorsequenzen isolieren. Beispiele für regulatorische Sequenzen, die für eine samenspezifische Transkription der erfindungsgemäßen Sequenzen bzw. Fragmenten davon besonders geeignet sind, sind der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Bäumlein H. et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225: 459-467;
20 Bäumlein H. et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225: 121-128), der LeB4-Promotor aus *Vicia faba* (Nagy I. (1990) Untersuchungen zur Expression und Regulation samenspezifischer Gene von *Vicia faba*“ Dissertation, Universität Halle) und der DC3-Promotor aus *Daucus carota* (Steffens W.S. et al. (1990) Dev. Genet. 11 (1): 65-76).
Eine weitere bevorzugte Ausführungsform stellt der napin-Promotor dar.

25

Besonders bevorzugt handelt es sich bei den regulatorischen Sequenzen um solche eines USP- oder LeB4-Promotors.

Diese samenspezifischen Promotoren können sowohl für Antisense-, Sense- als auch
30 PTGS-Konstrukte eingesetzt werden, um Veränderungen des Sinapin-Biosynthese-

wegs mit dem Ziel einer Verminderung des Sinapingehalts in den Samen zu erreichen.

Obwohl eine samenspezifische Expression bevorzugt wird, kommt für die Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in pflanzlichen Zellen jede Art von regulatorischer Sequenz in Frage, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hier ist jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor eingeschlossen. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in Samengewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In bezug auf die zu transformierende Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Bei Verwendung eines konstitutiven Promotors kann eine zell- bzw. gewebespezifische Expression auch dadurch erreicht werden, dass die Genexpression in den Zellen bzw. Geweben, in denen sie nicht erwünscht ist, gehemmt wird, beispielsweise durch Ausprägung von Antikörpern, die das Genprodukt binden und somit seine Enzymaktivität unterbinden, oder durch geeignete Inhibitoren.

Samenspezifische Gene bzw. Promotoren kann der Fachmann dem Stand der Technik, insbesondere den einschlägigen wissenschaftlichen Journalen und Gen-datenbanken entnehmen. Darüber hinaus ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien, samenspezifische regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt aus Samengewebe des gewünschten Organismus, aus dem die regulatorischen Sequenzen isoliert werden sollen, die gesamte PolyA⁺-RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen, die auf PolyA⁺-RNA-Molekülen aus einem Nicht-Samengewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende

PolyA⁺-RNA-Moleküle lediglich in Samengewebe akkumulieren. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNAs Promotoren isoliert, die über samenspezifische regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann stehen darüber hinaus weitere, auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter samenspezifischer Promotoren zur Verfügung.

Ferner sind optional Transkriptions- bzw. Terminationssequenzen vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines PolyA-Schwanzes an das Transkript dienen können, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und beliebig austauschbar.

Schließlich erfolgt die Herstellung chimärer Genkonstrukte, in denen SGT-kodierende DNA-Sequenzen unter Kontrolle von regulatorischen Sequenzen stehen, die eine samenspezifische Transkription gewährleisten, mittels konventioneller Klonierungsmethoden (siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989), supra). Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend:

- a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen, insbesondere in Pflanzensamen aktiven Promotors;
- b) operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert; oder ein Fragment der DNA-Sequenz, das für eine Suppression der endogenen SGT-Enzymaktivität ausreicht, und
- c) ggf. operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzenzellen dienen können.

Wie oben erläutert, kann die operative Verknüpfung der SGT-DNA-Sequenz (b) mit den regulatorischen Sequenzen (a) in Sense- oder Antisense-Orientierung der SGT-DNA-Sequenz erfolgen.

Die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder nach bekannten Verfahren synthetisiert werden. Vorzugsweise stammt die erfindungsgemäße DNA-Sequenz
5 aus *Brassica*, insbesondere aus *Brassica napus*.

Mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989), supra), ist es möglich, gewünschte Konstrukte für die Transformation von Pflanzen vorzubereiten bzw. herzustellen. Die für die gentechnische
10 Manipulation in prokaryontischen Zellen üblicherweise eingesetzten Klonierungs-, Mutagenisierungs-, Sequenzanalyse-, Restriktionsanalyse- und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden sind dem Durchschnittsfachmann wohl bekannt. So können nicht nur geeignete chimäre Genkonstrukte mit der gewünschten Fusion von Promotor und SGT-DNA-Sequenz hergestellt werden, vielmehr kann der Fachmann
15 mittels Routinetechniken, falls erwünscht, verschiedenartige Mutationen oder Deletionen in die SGT-kodierende DNA-Sequenz einführen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend
20 aus:

- a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID No. 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren;
- b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 angegebene Nukleotidsequenz
25 oder Teile davon umfassen;
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisieren, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen;
- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz
30 von c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen;

- 12 -

- e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989, supra) beschrieben sind. Geeignete stringente Bedingungen schließen Salzlösungen von etwa 0,9 molar bei Temperaturen von 35°C bis 65°C ein. Bevorzugt schließen stringente Hybridisierungsbedingungen folgende Bedingungen ein:

- | | | | | |
|----|----------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| 10 | Hybridisierungspuffer: | 7 % SDS | | |
| | | 250 mM NaCl | | |
| | | 250 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 | | |
| | | 1 mM EDTA | | |
| | Hybridisierungstemperatur: | 58°C bis 60 °C | | |
| 15 | Hybridisierungszeit: | über Nacht | | |
| | Waschpuffer: | I | 2 x SSC | 0,1 % SDS |
| | | II | 0,2 x SSC | 0,1 % SDS |
| | Waschtemperatur und -zeit: | jeweils 2 x 30 min. bei 55°C bis 60°C | | |

- 20 DNA-Sequenzen, die mit den DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodieren, hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger DNA-Sequenzen kann z.B. unter Verwendung von DNA-Sequenzen erfolgen, die exakt oder im wesentlichen eine der oben erwähnten SGT-kodierenden Nukleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenzen aufweisen, bzw. der reversen Komplemente dieser DNA-Sequenzen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (s. z.B. Sambrook et al. (1989), supra). Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe üblicher Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit einer der oben erwähnten DNA-Sequenzen für SGT oder einem Teil einer
- 25
- 30

dieser Sequenzen übereinstimmt. Die DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodieren, umfassen auch DNA-Sequenzen, deren Nukleotidsequenz zu einer der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen degeneriert ist.

5

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodieren. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Sequenzen sich von den oben beschriebenen DNA-Sequenzen an einer oder mehreren Positionen unterscheiden, aber einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei, eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, 70%, vorzugsweise von mindestens 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, und besonders bevorzugt von mindestens 90%, 92%, 94%, 96%, 98%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen DNA-Sequenzen können dabei beispielsweise durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

10
15

Bei den DNA-Sequenzen, die homolog zu den oben beschriebenen Sequenzen sind und Derivate dieser Sequenzen darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Sequenzen, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

20
25

- 14 -

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stammt die beschriebene, für eine SGT kodierende DNA-Sequenz aus *Brassica napus* (wie in SEQ ID No. 1 angegeben).

- 5 Die von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kodierten Enzyme weisen eine Aminosäuresequenz auf, die mit der in SEQ ID No. 3 angegebenen Sequenz in mindestens 30%, 40% der Aminosäuren, insbesondere in mindestens 50%, 60%, 70%, vorzugsweise in mindestens 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, und besonders bevorzugt in mindestens 90%, 92%, 94%, 96%, 98% der Aminosäuren übereinstimmt.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren und Mikroorganismen, die erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthalten und deren Verwendung die Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen ermöglicht, deren Sinapingehalt gegenüber Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. -Pflanzen verringert ist. Dabei handelt es sich bei den Vektoren insbesondere um Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren. Bei den Mikroorganismen handelt es sich in erster Linie um Bakterien, Viren, Pilze, Hefen und Algen.

15

Des weiteren wird bei der vorliegenden Erfindung ein rekombinantes Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT aus *Brassica*, insbesondere ein rekombinantes Protein mit der in SEQ ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz bereitgestellt.

20

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einem gegenüber Wildtyp-Pflanzen bzw. -pflanzenzellen verringerten Sinapingehalt, umfassend die folgenden Schritte:

25

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, das folgende Sequenzen umfasst:
 - regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors;

- 15 -

- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert; und
 - optional operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzenzellen dienen können;
- b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen; und
- c) gegebenenfalls die Regeneration intakter Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.

Die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, liegt bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung als Antisense-, Sense- bzw. Cosuppressionskonstrukt oder als PTGS-Konstrukt vor, um die Expression der SGT in der transformierten Pflanze bzw. Pflanzenzelle zu hemmen bzw. vollständig zu unterdrücken und somit eine Reduzierung des Sinapingehalts in den transformierten Pflanzen herbeizuführen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist, dass durch die Blockierung der Sinapin-Biosynthese die Verfügbarkeit der Cumarsäure, eines Intermediats der Sinapin-Biosynthese, gesteigert wird. Die Cumarsäure wird zur Biosynthese von Resveratrol benötigt, das ernährungsphysiologisch von Bedeutung ist. Ferner führt die Blockierung der Sinapin-Biosynthese zur Akkumulation von freiem Cholin. Dadurch wird als weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung die Verfügbarkeit des Cholins für die Lecithin-Biosynthese erhöht, was bei transformierten Ölsaaten zu einer Erhöhung des Fettsäuregehalts, z.B. von Palmitinsäure, Stearinsäure, Palmitoleinsäure, Oleinsäure, Linolsäure, Linolensäure führt.

Die Erfindung betrifft ferner Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodieren,

enthalten. Die Erfindung betrifft ebenfalls Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial transgener Pflanzen sowie die transgenen Pflanzen selbst, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten. Die transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung weisen aufgrund der Einführung einer SGT-kodierenden DNA-Sequenz vorzugs-
5 weise in Antisense-Orientierung oder als Cosuppressionskonstrukt in den Samen einen geringeren Gehalt an Sinapin auf.

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können aus den mit einer erfindungsgemäßen SGT-DNA-Sequenz transformierten Pflanzen pflanzliches
10 Protein gewonnen werden, das einen gegenüber aus Wildtyp-Pflanzen gewonnenem Protein verringerten Sinapingehalt aufweist und somit vorteilhaft für Ernährungszwecke eingesetzt werden kann.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das
15 pflanzliche Protein mit einem verringerten Sinapingehalt aus mit einer erfindungsgemäßen SGT-DNA-Sequenz in Antisense-Orientierung oder als Cosuppressionskonstrukt transformiertem Raps gewonnen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren
20 Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene
25 Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysenmethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-
30 molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die

Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von
5 Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen, wie bereits oben erwähnt, die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels
10 der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie gehören.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se
15 keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate, verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens
20 empfehlenswert. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der
25 Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in
30 einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren

können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt.

- Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker, Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker
5 verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgenen Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation, Sequenz-spezifische Rekombinasen.
- 10 Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit der eingeführten Nukleinsäure, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer
15 SGT kodiert, untersucht werden.

- Bei der transgenen Pflanze bzw. den transgenen Pflanzenzellen kann es sich um jede beliebige monokotyle oder dikotyle Pflanze bzw. Pflanzenzelle handeln, die einen unerwünscht hohen Gehalt an Sinapin aufweist. Vorzugsweise handelt es sich um
20 Nutzpflanzen bzw. Zellen von Nutzpflanzen. Besonders bevorzugt handelt es sich um Ölsaaten, hier ganz besonders bevorzugt um Raps oder Rübsen, Getreide, Zuckerrübe, Mais, Sonnenblume und Lein. Prinzipiell ist jede Nutzpflanze für die Umsetzung der Erfindung erstrebenswert, die für Ernährungszwecke geeignet ist.

- 25 Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial und Ernteprodukte der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge usw.

- Die spezifische Expression der SGT in den Samen der erfindungsgemäßen Pflanzen
30 bzw. in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen kann mit Hilfe herkömmlicher mole-

- 20 -

kularbiologischer und biochemischer Methoden nachgewiesen und verfolgt werden. Dem Fachmann sind diese Techniken bekannt und er ist problemlos in der Lage, eine geeignete Nachweismethode zu wählen, beispielsweise eine Northern-Blot-Analyse zum Nachweis SGT-spezifischer RNA bzw. zur Bestimmung der Höhe der Akku-
5 mulation von SGT-spezifischer RNA oder eine Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung von für SGT-kodierende DNA-Sequenzen.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von pflanzlichem Protein mit einem gegenüber Wildtyp-Pflanzenprotein verringerten Sinapingehalt, umfas-
10 send die folgenden Schritte:

- a) die Übertragung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls oder Vektors, der eine DNA-Sequenz enthält, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, auf Pflanzenzellen;
- 15 b) die Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen;
- c) die Verarbeitung der Samen der Pflanzen aus b) zur Gewinnung von pflanzlichem Protein mit einem verringerten Gehalt an Sinapin.

Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen, die nur der Veranschaulichung der Erfindung dienen und in keiner Weise als Einschränkung zu verstehen sind, erläutert.
20

Beispiele

25 Aus Raps (*Brassica napus*) wurde eine cDNA isoliert, die für das Enzym UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) kodiert. Wie bereits vorstehend erwähnt, katalysiert die SGT die Umsetzung von UDP-Glucose und Sinapinsäure zu 1-O-Sinapoylglucose (SinGlc), die wiederum als aktivierter Acyldonator für die Sinapin-Biosynthese fungiert.

a) Selektionsmethode

Aus unreifen Samen und Kotyledonen von *Brassica napus*-Keimpflanzen der Sorte Express wurden cDNA-Banken angelegt. Als Vektor diente der modifizierte λ -Phage Uni-ZAP XR (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Mit diesen cDNA-Banken als Template wurden mit Hilfe von PCR Glucosyltransferase-spezifische Sequenzen amplifiziert. Als PCR-Primer in "forward"-Orientierung dienten Oligonukleotide, deren Sequenzen von einer in Glucosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels hochkonservierten Region, der PSPG-Box abgeleitet sind (PSPG = "plant secondary product glucosyltransferase", Proteinsequenzmotiv der PSPG-Box: THCGWN; Hughes J. and Hughes M.A. (1994) DNA Sequence 5: 41-49). U.a. wurde als forward-Primer folgendes Oligonukleotid eingesetzt:

5'-ACNCAYTGYGGNTGGAAC-3'. Als "Reverse-Primer" wurde der T7-Primer eingesetzt. Die PCR-Reaktion lief nach folgendem Protokoll ab (Eppendorf-Mastecycler):

	„hot start“:	94°C 4 min.
	30 Zyklen:	94°C 1 min. (Denaturierung)
		56°C 1 min. (Annealing)
20		72°C 2 min. (Synthese).

Der Reaktionsansatz enthielt:

	dATP, dGTP, dCTP, dTTP:	je 200 μ M
25	Primer (forward PSPG, T7):	je 100 pMol
	Raps-cDNA-Banken aus unreifen Samen bzw.	
	Kotyledonen	je 3 x 10 ⁶ pfu*
	Taq-DNA-Polymerase (Appligene):	1 unit
	Puffer für Taq-Polymerase	

- 22 -

Wasser

(*pfu = plaques forming units)

- Die über PCR amplifizierten Fragmente wurden mit α -[^{32}P]dATP markiert und als
- 5 Sonden zur Hybridisierung gegen die *Brassica napus*-cDNA-Banken aus Samen und Kotyledonen eingesetzt. Positive Klone wurden isoliert, die rekombinanten pBlue-script-Phagemide über die in vivo-"Excisions"-Technik (Stratagene) ausgeschnitten und in *E. coli* (XL1-Blue MRF'; Stratagene) transformiert.
- 10 Von allen auf diese Weise isolierten cDNA-Fragmenten aus *Brassica napus* wurde vom 5'-Ende her die DNA-Sequenz bestimmt. Eine der cDNA-Sequenzen konnte sowohl aus den Samen ("SP15") als auch aus den Cotyledonen ("CP5") isoliert werden, wobei sie in den Samen in höherer Abundanz auftritt. Diese Sequenz zeigte die höchste Identität zu einer "probable indole-3-acetate β -glucosyltransferase"
- 15 (E71419) aus *Arabidopsis thaliana*. Ihr Leserahmen kodiert für ein Protein mit 497 Aminosäuren (siehe SEQ ID No. 3). Dieses Protein zeigte eine hohe SGT-Aktivität. Die kodierende Sequenz befindet sich in der Gendatenbank unter der Accession-No. AF287143, die Proteinsequenz unter der Accession-No. AAF98390; siehe auch Milkowski et al. (2000) Planta 211: 883-886.

20

b) Funktioneller Test

- Da in den rekombinanten pBluescript-Phagemiden die cDNA's "downstream" vom
- 25 *E. coli-lac*-Promotor inseriert sind, wurden klonierte Gene im *E. coli*-Wirt exprimiert. Zum Test auf SGT-Aktivität wurden die *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue MRF, die Phagemide mit den Inserts "CP5" und "SP15" tragen, mit UDP-Glucose und Sinapinsäure inkubiert (60 min bei 32°C). Die Zellen wurden anschließend lysiert, die Extrakte mit Trifluoressigsäure gefällt und die Überstände mit

- 23 -

Hilfe der HPLC analysiert. Das Elutionsprofil ergab in beiden Fällen das erwartete Reaktionsprodukt, das massenspektroskopisch (LC-MS) als Sinapoylglucose identifiziert werden konnte.

- 5 Damit wurde eindeutig gezeigt, dass die SGT-cDNA aus *Brassica napus* kloniert wurde.

c) Tagging und Aufreinigung der SGT

10

Mittels PCR wurde die vollständige cDNA-Sequenz der SGT von *B. napus* amplifiziert (ohne Stopcodon), wobei Restriktionsschnittstellen für *Nco*I (am 5'-Ende) und *Bam*HI (am 3'-Ende) eingefügt wurden. Als Template diente der pBluescript-Vektor, der die gesamte SGT-cDNA aus *B. napus* enthält. Das erhaltene PCR-Fragment
15 wurde in den *Nco*I - *Bam*HI-gespaltenen Vektor pQE60 (Qiagen, Hilden) kloniert. Die Konstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm M15/pREP4 (Qiagen, Hilden) transformiert.

- 20 Der *Nco*I-Forward-Primer ist weiter unten angegeben, gleiches gilt für den *Bam*HI-reverse-Primer.

d) Anzucht der *E. coli*-Kulturen und Induktion der SGT-Expression

- 25 Die Zellen wurden in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) in Schüttelkultur (Batch-Kultur; 400 ml) bei 37°C angezogen. In der frühen logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀=0,3) wurde zur Induktion der Expression der rekombinanten SGT Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) zugegeben (23,8 mg/ml) und die Zellen anschließend über Nacht bei 30°C weiterkultiviert.

Durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4°C) wurden die Zellen geerntet und umgehend bei - 80°C eingefroren.

5 e) Proteinextraktion und Reinigung

E. coli-Zellen aus 12 l Kultur (ca. 10 g Trockenmasse) wurden in 50 mM Phosphatpuffer, pH 8, der zusätzlich 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol enthält (Aufschlußpuffer), suspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die spezifische SGT-Aktivität des Rohextrakts betrug 1,2 nkat/mg Protein. Der Extrakt wurde auf eine Kobaltagarosesäule (5 cm x 2,6 cm i. d., Flussrate 3 ml/min) gegeben. Nach dem Spülen der Säule mit Aufschlußpuffer wurde noch mit drei Säulenvolumen Waschpuffer (wie Aufschlußpuffer, aber mit 20 mM Imidazol) unspezifisch gebundenes Protein eluiert. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Phosphatpuffer, der 0,25 M Imidazol enthielt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt (Ausbeute 3,7 mg). Die weitere Reinigung der SGT erfolgte durch Gelfiltration (Superdex 200; 26/60). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit Centricon-Filtereinheiten konzentriert (Ausbeute 1,2 mg Protein). Ein letzter Reinigungsschritt erfolgte durch hydrophobe Interaktion mit Phenylsuperose HR 5/5. Die Proteinausbeute nach dieser Reinigung betrug 570 µg, die spezifische Aktivität 400 nkat/mg Protein. Damit konnte eine Anreicherung auf das 400fache erreicht werden.

Die Bestimmung der Molmasse erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese sowie Gelfiltration auf einer Superose 12 Säule. Die Gelelektrophorese ergab für die rekombinante SGT eine Molmasse von 62 kDa; mit der Gelfiltration wurden 60 kDa ermittelt.

f) Enzymassay

Für die kinetischen Untersuchungen wurde das Eluat der Kobaltagarosesäule nach Fällung mit Ammoniumsulfat und Entsalzung eingesetzt. Zur Stabilisierung wurde
5 1 mg/ml Rinderserumalbumin zugegeben.

Der Enzymassay enthielt 20 mM UDP-Glukose, 900 ng Enzym und Sinapinsäure verschiedener Konzentration (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 4 mM). Als Puffer wurde 0,1 M MES, pH 6,0, bei Inkubationszeiten von 2,5; 5 und 10 Minuten verwendet. Für
10 Sinapinsäure wurde ein K_m -Wert von 0,13 mM ermittelt.

g) Herstellung transgener Pflanzen

Die das SGT-Protein kodierende DNA-Sequenz wird in antisense-Orientierung mit
15 einem samenspezifischen Promotor, vorzugsweise USP-, LeB4- oder napin-Promotor, fusioniert. Der Suppressionsansatz der double strand RNA interference (dsRNAI-Suppression) ist ebenfalls bevorzugt, dieser Ansatz ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

20 Die Promotor-SGT-antisense-Fusion bzw. das dsRNAI-Suppressionskonstrukt wird auf einen für die Transformation von Raps geeigneten Vektor gebracht und das resultierende Konstrukt auf Raps übertragen. Von den transgenen Rapspflanzen werden unreife Samen geerntet. Im Rohextrakt wird über HPLC-Analyse der Gehalt an 1-*O*-Sinapoylglucose sowie an 1-*O*-Sinapoylcholin (Sinapin) bestimmt. Außer-
25 dem wird die SGT-Aktivität gemessen.

- 26 -

Konstruktion von Plasmiden für die Suppression der SGT-Expression in transgenen Pflanzen, insbesondere in *Brassica napus* und *Arabidopsis*:

Konstruktion eines Suppressionsvektors für *Brassica napus*

5

Klonierung eines verkürzten Introns aus *Arabidopsis*

Aus genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* wurde zunächst über PCR eine Sequenz aus dem Intron 1 des FAD2-Gens amplifiziert (Okuley et al. (1994) Plant Cell 6: 147-158). Hierzu wurden folgende Primer eingesetzt:

FAD1-fw (forward):
 ACCCGGGACTCCATGGTAAGTCGTATTCTCAACGCAATCG
 FAD1-NB (reverse):
 15 TGGATCCAGTGCTAGCTGCAGAAAACCAAAAGC

Das amplifizierte Fragment enthält den 3'-Teil des FAD2-Introns (264 Nukleotide) und ist flankiert von den Restriktionsschnittstellen für *Sma*I und *Nco*I (am 5'-Ende) sowie *Nhe*I und *Bam*HI (am 3'-Ende).

20

Die amplifizierte Sequenz ist wie folgt:

5'-

ACCCGGGACTCCATGGTAagtcgtattctcaacgaatcgttttgtattctcacattatgccgtctctact
 25 cttattccttttggtccacgatttctattgtggcaatcccttcacaacctgattcccactttggatcattgtctgaagactc
 tctgaatcgtagcattgtttctgtcatgctctgttttagaattaatgataaaactatccatagcttgagtttcagcttgtt
 gattcttttgcttttggtttctgcagCTAGCACTGGATCCA – 3'

(Die klein geschriebene Sequenz ist die Intronsequenz; groß geschriebene Nukleotide stammen aus den angefügten Primer-Sequenzen.)

30

- 27 -

Dieses Fragment wurde als *Sma*I-*Bam*HI-Fragment in den ebenfalls mit *Sma*I und *Bam*HI verdauten Vektor pBNN kloniert. Der Vektor pBNN ist ein Derivat von pBIKS, das den napin-Promotor 590 und den nos-Terminator trägt. Zwischen

5 Promotor und Terminator befinden sich unikale Restriktionsschnittstellen für die Klonierung. Das resultierende Konstrukt pBNN-FS trägt das verkürzte FAD2-Intron zwischen nap-Promotor und nos-Terminator.

Klonierung eines SGT-Fragments in antisense-Orientierung in pBNN-FS

10

Das Plasmid pB-SGT1, pBluescript SK mit der vollständigen cDNA der *Brassica napus* SGT1 als EcoRI-XhoI-Fragment, diente als Template, um über PCR ein spezifisches Fragment der SGT1-Sequenz zu amplifizieren. Es wurden folgende Primer eingesetzt:

15

Nco-SGT (forward): GCTCGGTACCCCATGGAACATCATCTTCTCC

Sma-SGT (reverse): GTACCCGGGGAAGCTAGGCAAGCACAAGACTGG

Das amplifizierte Fragment enthält den 5'-Teil der kodierenden Region der SGT1-cDNA (470 Nukleotide, Beginn mit dem A des Startcodons) und ist flankiert von den

20 Restriktionsschnittstellen für *Nco*I (5') und *Sma*I (3').

GctcgggtaccccATGGAACATCATCTTCTCCTTTACCTCCTCATGTTATGCTTG
TATCCTTCCCAGGACAAGGCCACGTTAATCCACTTCTTCGTCTCGGCAAG
25 CTCTTAGCTTCGAAGGGTTTACTCGTCACTTTTGTCAACACAGAATCATGG
GGCAAAAAGATGCGAACCGCCAACAAGATTCAAGACCGAGCCCTCAAAC
CTATCGGTAAAGGTTATCTCCGGTTCGATTTCTTCAACGATGGGCTCCCTG
AAGACGACGATGCAAGCAGAACCAACTTAACCATCCTCCGACCACAAC
CGAGCTGGTCGGACAACAAGAGATCAAAAACCTCGTGAAACGTTACAAG

- 28 -

GAAGTGATGAAACAGCCCGTGACGTGTCTCATCAACAACCCTTTCGTCTC
 TTGGGTCTGTGACGTAGCCGAAGATCTTCAAATCCCCTGTGCTGTTCTCTG
 GGTCCAGTCTTGTGCTTGCCTAGCTTCccccgggtac

- 5 (Die groß geschriebene Sequenz ist die SGT1-Sequenz; klein geschriebene Nukleotide stammen aus den angefügten Primer-Sequenzen.)

- Dieses Fragment wurde als *NcoI-SmaI*-Fragment in den *NcoI*- und *SmaI*-gespaltenen Vektor pBNN-FS kloniert. Das resultierende Konstrukt pBNN-SGT-FS enthält die
- 10 SGT-Sequenz in antisense-Orientierung zwischen nap-Promotor (nap = Napin) und verkürztem FAD2-Intron.

- Klonierung des SGT-Fragments in sense-Orientierung in pBNN-SGT-FS
- 15

Dieselbe SGT1-Sequenz wie oben für die Klonierung in antisense-Orientierung in pBNN-FS beschrieben wurde über PCR mit folgenden Primern amplifiziert:

- NheI*-SGT (forward): GTAGCTAGCATGGAAGTATCATCTTCTCC
- 20 *BamHI*-SGT (reverse): GTAGGATCCGAAGCTAGGCAAGCACAAGACTGG

Das Fragment wurde als *NheI-BamHI*-Fragment in den *NheI-BamHI*-gespaltenen Vektor pBNN-SGT-FS kloniert.

- 25 Das resultierende Konstrukt pBNN-sup-nap enthält folgende Kassette (Suppressionskassette): nap 590-Promotor – SGT1 (470 bp antisense) verkürztes FAD2-Intron – SGT1 (470bp sense) – nos-Terminator.

Klonierung der Suppressionskassette aus pBNN-sup-nap in den binären Vektor pLH7000

Das Plasmid pBNN-sup-nap wurde mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert. Die
 5 überhängenden Enden wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend
 wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten. Das die Suppressionskassette
 enthaltende DNA-Fragment wurde isoliert und in den *SmaI-HindIII*-doppelverdauten
 binären Vektor pLH7000 kloniert (Hausmann and Töpfer (1999) Entwicklung von
 Plasmid-Vektoren in: Vorträge für die Pflanzenzüchtung Heft 45, „BioEngineering
 10 für Rapssorten nach Maß, -Ergebnisse eines BMBF-Forschungsverbunds-“, Hrsg. D.
 Brauer, G. Röbbelen und R. Töpfer, Seiten 155-171).

Das resultierende Plasmid pLH7000-sup-nap wurde zur Transformation von Raps
 eingesetzt. Transgene Pflanzen mit gegenüber Wildtyppflanzen verringertem Sina-
 15 pingehalt konnten selektioniert und intakte Pflanzen regeneriert werden.

In ähnlicher Weise wie oben insbesondere für *B. napus* beschrieben wurden auch
 Suppressionsvektoren für die Übertragung auf *A. thaliana* konstruiert. Der Unter-
 20 schied bestand lediglich darin, dass anstelle des SGT1-Fragments ein Fragment von
 AtSGT1 in antisense- sowie sense-Orientierung kloniert wird. AtSGT1 ist in
 Milkowski et al. (2000) FEBS Letters 486: 183-184 beschrieben; in der Gendaten-
 bank findet sich die Sequenz des SGT-Gens aus *A. thaliana* unter der Accession-No.
 BAB02351. Das amplifizierte Fragment enthält den 5'-Teil der codierenden Region
 25 der AtSGT1-cDNA (259 Nucleotide, Beginn mit dem A des Startcodons).

atggagctagaatcttctcctctctacctcctcatgtgatgctcgtatctttccagggaaggccacgttaatccact
 tcttcgtcttggaagctcttagcttcaaagggttgctcataaccttcgtcaccactgagtcatggggcaaaaagatgc
 gaatctccaacaaaatccaagaccgtgtcctcaaaccggttgtaaggctatctccggtatgatttctcgacgacggg
 30 ctctctgaagacgacgaag

- 30 -

(Die dargestellte Sequenz zeigt nur den klonierten Teil aus AtSGT1, auf die Darstellung der angrenzenden Primer-Sequenzen wurde hier verzichtet.)

- 5 Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 1 dargestellt. dsRNAI steht für double strand RNA interference, wie oben erläutert.

Es ist klar, daß neben den oben erwähnten Vektoren pBNN und pLH7000 jeder andere für die Erstellung der gewünschten Antisense- bzw. dsRNAI-Konstrukte
10 geeignete bzw. für die Pflanzentransformation geeignete Vektor eingesetzt werden kann. Entsprechende Vektoren sind dem auf dem Gebiet der Pflanzenbiotechnologie tätigen Fachmann bestens bekannt.

15 Abbildungen

Abb. 1 zeigt in schematisierter Form die Erzeugung der dsRNAI-Suppressionskonstrukte.

A N S P R Ü C H E

- 5 1. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend
- a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors;
 - b) operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) kodiert, oder ein Fragment davon, daß für die Inhibierung der endo-
 - 10 genen SGT-Expression ausreicht, und
 - c) optional operativ damit verknüpft regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzenzellen dienen können.
- 15 2. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin die DNA-Sequenz aus *Brassica* stammt.
3. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, worin die DNA-Sequenz aus *Brassica napus* stammt.
- 20 4. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus
- a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,
 - 25 b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder Teile davon umfassen,
 - c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisieren, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,

- 32 -

- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz von c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,
- e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

5

5. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, in dem die DNA-Sequenz ausschließlich oder zusätzlich zur sense-Orientierung in der Antisense-Orientierung vorliegt.

10

6. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, in dem die DNA-Sequenz als Cosuppressions-Konstrukt oder double strand RNA interference Suppressionskonstrukt vorliegt.

15

7. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Promotor ein in Pflanzensamen aktiver Promotor, insbesondere ein USP-, LeB4- oder napin-Promotor ist.

20

8. Vektor, umfassend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

9. Mikroorganismus, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

25

10. Rekombinantes Protein mit der enzymatischen Aktivität einer UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT), insbesondere aus *Brassica* stammend.

11. Rekombinantes Protein nach Anspruch 10 mit der in SEQ ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz.

12. Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einem gegenüber Wiltypfpflanzen bzw. -pflanzenzellen verringerten Sinapingehalt, umfassend die folgenden Schritte:

- 5 a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, das folgende Sequenzen umfasst:
- regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors;
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert; und
 - optional operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als
- 10 Transkriptions-Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzenzellen dienen können;
- b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen; und
- c) gegebenenfalls die Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.

15

13. Transgene Pflanzenzellen, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, oder hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 12.

20

14. Transgene Pflanzen, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 13 oder hergestellt nach Anspruch 12, sowie Teile dieser Pflanzen, transgene Erzeugnisse und transgenes Vermehrungsmaterial dieser Pflanzen, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen, Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanzen.

25

15. Transgene Pflanzen nach Anspruch 14, wobei es sich um Ölsaaten, insbesondere Raps handelt.

- 34 -

16. Verfahren zur Gewinnung von pflanzlichem Protein mit einem gegenüber Wildtyp-Pflanzenprotein verringerten Sinapingehalt, umfassend die folgenden Schritte:

- a) die Übertragung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls oder Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 8 auf Pflanzenzellen;
- b) die Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen;
- c) die Verarbeitung der Samen der Pflanzen aus b) zur Gewinnung von pflanzlichem Protein mit einem verringertem Gehalt an Sinapin.

17. Pflanzliches Protein mit einem gegenüber Wildtyp-Pflanzenprotein verringerten Sinapingehalt, hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 16.

18. Verwendung einer DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, in Antisense-Orientierung, als Cosuppressionskonstrukt oder als double strand RNA interference Suppressionskonstrukt zur Verringerung des Sinapingehalts in Pflanzen, insbesondere Rapspflanzen.

19. Verwendung einer DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, in Antisense-Orientierung und/oder sense-Orientierung zur Erhöhung des Lecithingehalts in Pflanzen.

20. Verwendung einer DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SGT kodiert, in Antisense-Orientierung und/oder sense-Orientierung zur Erhöhung des Resveratrolgehalts in Pflanzen.

21. Verwendung der nach Anspruch 12 hergestellten Pflanzen zur Gewinnung von pflanzlichem Protein mit einem im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzenprotein verringerten Gehalt an Sinapin.

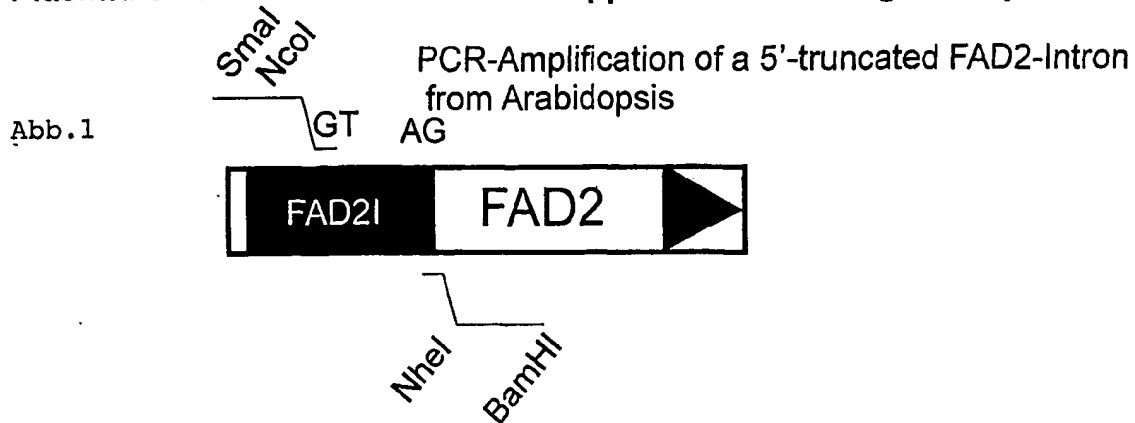
- 35 -

22. DNA-Sequenz ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

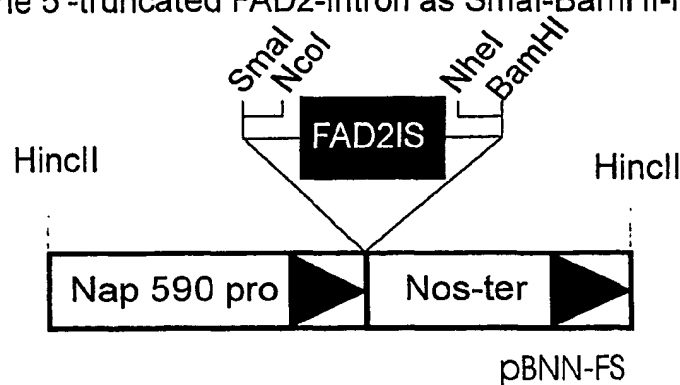
- a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,
- b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 angegebene Nukleotidsequenz oder
5 Teile davon umfassen,
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisieren, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,
- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz
10 von c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,
- e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

15

Plasmid construction for dsRNAi-suppression of SGT gene expression

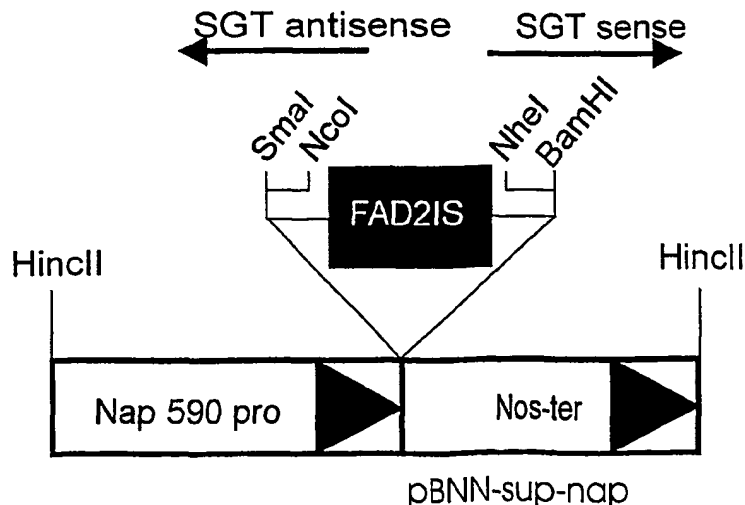


Cloning of the 5'-truncated FAD2-Intron as Smal-BamHI-Fragment in pBNN



PCR-amplification of the appropriate cDNA-Fragments From *B.napus* SGT1 (about 470 bp 5') and Arabidopsis SGT (about 250 bp 5')

Cloning in antisense (NcoI-Smal-Fragment) and sense (NheI-BamHI-Fragment) Directions in pBNN-FAD2is vector



Cloning of the SGT-dsRNAi-fragment as NotI (blunted)-HindIII-fragment in binary vector pLH7000

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institut fuer Pflanzenbiochemie Halle
- (B) STRASSE: Weinberg 3
- (C) ORT: Halle
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 06120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Beeinflussung des Sinapingehalts in transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1715 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAAAAACAGA GCACACAGAA GAGAACCCCT TTTTGAAGGA TGGAACATC ATCTTCTCCT	60
TTACCTCCTC ATGTTATGCT TGTATCCTTC CCAGGACAAG GCCACGTAA TCCACTTCTT	120
CGTCTCGGCA AGCTCTTAGC TTCGAAGGGT TTA CTGTCAC CTTTTGTAC CACAGAATCA	180
TGGGGCAAAA AGATGCGAAC CGCCAACAAG ATTCAAGACC GAGCCCTCAA ACCTATCGGT	240
AAAGGTTATC TCCGGTTCGA TTTCTTCAAC GATGGGCTCC CTGAAGACGA CGATGCAAGC	300
AGAACCAACT TAACCATCCT CCGACCACAA CTCGAGCTGG TCGGACAACA AGAGATCAAA	360
AACCTCGTGA AACGTTACAA GGAAGTGATG AAACAGCCCG TGACGTGTCT CATCAACAAC	420
CCTTTCGTCT CTTGGGTCTG TGACGTAGCC GAAGATCTTC AAATCCCCTG TGCTGTTCTC	480
TGGGTCCAGT CTTGTGCTTG CCTAGCTTCT TATTATTATT ACAACCACAA GCTTGTCGAC	540
TTCCCGACCG AAACAGATCC CAAGATCGAT GTCCAGATCC CGTGCATGCC TGTCTTGAAA	600
CACGACGAGA TCCCTTCTTT CATCCATCCT TTTTCACCTT ATTCGGGTTT AAGAGAAGTG	660
ATCATTGATC AGATCAAACG TCTTCACAAG CCTTTCGCTG TTCTCATCGA TACTTTCTAC	720
TCCTTGGAGA AAGATATCAT CGACCACATG ACAAACCTCT CTCGCACCGG CTTTGTGAGA	780
CCGCTCGGAC CGCTTTACAA AATGGCCAAA ACGTTGATTT GTGATGACAT CAAAGGAGAT	840

```

ATGTCTGAGA CGAGGGATGA CTGCATGGAG TGGTTAGACT CGCAGCCTGT TTCGTCCGTT      900
GTTTACATCT CATTTGGTAC CGTGGCTTAC GTGACACAAG AACAGATCAG CGAGATTGCG      960
TTAGGCGTTT TAAACGCTGA CGTTTCGTTT TGTGGGTGA TAAGACAACA AGAACTAGGT     1020
GTAAACAAAG AGCGACATGT TCTGCCTGAA GAACTCAAAG GGAAAGGTAA AGTCATTGAA     1080
TGGTGTTCAC AAGAGAAAAGT CTTAGCTCAT CCTTCTGTGG TTTGTTTCGT GACTCATTGT     1140
GGATGGAACCT CAACGATGGA AGCTTTGTCT AGTGGAGTCC CAACGGTCTG TTTTCCTCAG     1200
TGGGGAGATC AAGTCACCGA CGCTGCTTAC ATGATCGACG TGTTCAGAC GGGAGTGAGG     1260
CTTAGCCGTG GAGAGACGGA GGAGAGGGTG GTGCCTAGGG AGGAAGTAGC GGAGAGGCTG     1320
AGAGAAGTTA CGAAAGGAGA GAAAGCGACG GAGCTGAAGA AGAATGCTTT AAAATGGAAG     1380
GAGGAGGCGG AAGCGGCCGT GGCTCGCGGT GGTTCGTCGG ATCGGAATCT TGATGAGTTT     1440
GTGGAAAAGT TGGGCGTGAA ACCTGTGGCT AAACAGAACG GAAGTCTCAA TCAAAACGGA     1500
AGTATTCAAA AACTTTTATT GCAAAAGTCA TAAATGTGTT TTGTATTATC TGTGTTTGT      1560
TTTCTGCAAA TCCTGATAAT TGTGTTTGT TGTATGCTCC CTCCGTTCTT TGTTCCTCGTT     1620
TTTTTTTTGT ATGGGTTTGG GGAGACTAGT TATCCTTCTT GAATAAATGT TAGATCACGA     1680
CTTGTGTTCT TAAGATTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA      1715

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1715 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 40..1533

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

GAAAAACAGA GCACACAGAA GAGAACCCTT TTTTGAAGG ATG GAA CTA TCA TCT      54
                                   Met Glu Leu Ser Ser
                                   1           5

TCT CCT TTA CCT CCT CAT GTT ATG CTT GTA TCC TTC CCA GGA CAA GGC      102
Ser Pro Leu Pro Pro His Val Met Leu Val Ser Phe Pro Gly Gln Gly
              10              15              20

CAC GTT AAT CCA CTT CTT CGT CTC GGC AAG CTC TTA GCT TCG AAG GGT      150
His Val Asn Pro Leu Leu Arg Leu Gly Lys Leu Leu Ala Ser Lys Gly
              25              30              35

TTA CTC GTC ACT TTT GTC ACC ACA GAA TCA TGG GGC AAA AAG ATG CGA      198
Leu Leu Val Thr Phe Val Thr Glu Ser Trp Gly Lys Lys Met Arg
              40              45              50

```

ACC	GCC	AAC	AAG	ATT	CAA	GAC	CGA	GCC	CTC	AAA	CCT	ATC	GGT	AAA	GGT	246
Thr	Ala	Asn	Lys	Ile	Gln	Asp	Arg	Ala	Leu	Lys	Pro	Ile	Gly	Lys	Gly	
	55					60					65					
TAT	CTC	CGG	TTC	GAT	TTC	TTC	AAC	GAT	GGG	CTC	CCT	GAA	GAC	GAC	GAT	294
Tyr	Leu	Arg	Phe	Asp	Phe	Phe	Asn	Asp	Gly	Leu	Pro	Glu	Asp	Asp	Asp	
70					75					80					85	
GCA	AGC	AGA	ACC	AAC	TTA	ACC	ATC	CTC	CGA	CCA	CAA	CTC	GAG	CTG	GTC	342
Ala	Ser	Arg	Thr	Asn	Leu	Thr	Ile	Leu	Arg	Pro	Gln	Leu	Glu	Leu	Val	
				90					95					100		
GGA	CAA	CAA	GAG	ATC	AAA	AAC	CTC	GTG	AAA	CGT	TAC	AAG	GAA	GTG	ATG	390
Gly	Gln	Gln	Glu	Ile	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Arg	Tyr	Lys	Glu	Val	Met	
			105					110					115			
AAA	CAG	CCC	GTG	ACG	TGT	CTC	ATC	AAC	AAC	CCT	TTC	GTC	TCT	TGG	GTC	438
Lys	Gln	Pro	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Asn	Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Trp	Val	
		120					125					130				
TGT	GAC	GTA	GCC	GAA	GAT	CTT	CAA	ATC	CCC	TGT	GCT	GTT	CTC	TGG	GTC	486
Cys	Asp	Val	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Ile	Pro	Cys	Ala	Val	Leu	Trp	Val	
	135					140					145					
CAG	TCT	TGT	GCT	TGC	CTA	GCT	TCT	TAT	TAT	TAT	TAC	AAC	CAC	AAG	CTT	534
Gln	Ser	Cys	Ala	Cys	Leu	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	His	Lys	Leu	
150					155				160						165	
GTC	GAC	TTC	CCG	ACC	GAA	ACA	GAT	CCC	AAG	ATC	GAT	GTC	CAG	ATC	CCG	582
Val	Asp	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Asp	Pro	Lys	Ile	Asp	Val	Gln	Ile	Pro	
				170					175					180		
TGC	ATG	CCT	GTC	TTG	AAA	CAC	GAC	GAG	ATC	CCT	TCT	TTC	ATC	CAT	CCT	630
Cys	Met	Pro	Val	Leu	Lys	His	Asp	Glu	Ile	Pro	Ser	Phe	Ile	His	Pro	
			185					190					195			
TTT	TCA	CCT	TAT	TCG	GGT	TTA	AGA	GAA	GTG	ATC	ATT	GAT	CAG	ATC	AAA	678
Phe	Ser	Pro	Tyr	Ser	Gly	Leu	Arg	Glu	Val	Ile	Ile	Asp	Gln	Ile	Lys	
		200					205					210				
CGT	CTT	CAC	AAG	CCT	TTC	GCT	GTT	CTC	ATC	GAT	ACT	TTC	TAC	TCC	TTG	726
Arg	Leu	His	Lys	Pro	Phe	Ala	Val	Leu	Ile	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	
	215					220					225					
GAG	AAA	GAT	ATC	ATC	GAC	CAC	ATG	ACA	AAC	CTC	TCT	CGC	ACC	GGC	TTT	774
Glu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asp	His	Met	Thr	Asn	Leu	Ser	Arg	Thr	Gly	Phe	
230						235				240					245	
GTC	AGA	CCG	CTC	GGA	CCG	CTT	TAC	AAA	ATG	GCC	AAA	ACG	TTG	ATT	TGT	822
Val	Arg	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	Tyr	Lys	Met	Ala	Lys	Thr	Leu	Ile	Cys	
				250					255					260		
GAT	GAC	ATC	AAA	GGA	GAT	ATG	TCT	GAG	ACG	AGG	GAT	GAC	TGC	ATG	GAG	870
Asp	Asp	Ile	Lys	Gly	Asp	Met	Ser	Glu	Thr	Arg	Asp	Asp	Cys	Met	Glu	
			265					270					275			
TGG	TTA	GAC	TCG	CAG	CCT	GTT	TCG	TCC	GTT	GTT	TAC	ATC	TCA	TTT	GGT	918
Trp	Leu	Asp	Ser	Gln	Pro	Val	Ser	Ser	Val	Val	Tyr	Ile	Ser	Phe	Gly	
		280					285					290				
ACC	GTG	GCT	TAC	GTG	ACA	CAA	GAA	CAG	ATC	AGC	GAG	ATT	GCG	TTA	GGC	966
Thr	Val	Ala	Tyr	Val	Thr	Gln	Glu	Gln	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala	Leu	Gly	

295	300	305	
GTT TTA AAC GCT GAC Val Leu Asn Ala Asp 310	GTT TCG TTC TTG TGG Val Ser Phe Leu Trp 315	GTG ATA AGA CAA CAA GAA Val Ile Arg Gln Gln Glu 320	1014 325
CTA GGT GTA AAC AAA Leu Gly Val Asn Lys 330	GAG CGA CAT GTT CTG Glu Arg His Val Leu 335	CCT GAA GAA CTC AAA GGG Pro Glu Glu Leu Lys Gly 340	1062
AAA GGT AAA GTC ATT Lys Gly Lys Val Ile 345	GAA TGG TGT TCA CAA Glu Trp Cys Ser Gln 350	GAG AAA GTC TTA GCT CAT Glu Lys Val Leu Ala His 355	1110
CCT TCT GTG GTT TGT Pro Ser Val Val Cys 360	TTC GTG ACT CAT TGT Phe Val Thr His Cys 365	GGA TGG AAC TCA ACG ATG Gly Trp Asn Ser Thr Met 370	1158
GAA GCT TTG TCT AGT Glu Ala Leu Ser Ser 375	GGA GTC CCA ACG GTC Gly Val Pro Thr Val 380	TGT TTT CCT CAG TGG GGA Cys Phe Pro Gln Trp Gly 385	1206
GAT CAA GTC ACC GAC Asp Gln Val Thr Asp 390	GCT GCT TAC ATG ATC Ala Ala Tyr Met Ile 395	GAC GTG TTC AAG ACG GGA Val Phe Lys Thr Gly 400	1254 405
GTG AGG CTT AGC CGT Val Arg Leu Ser Arg 410	GGA GAG ACG GAG GAG Gly Glu Thr Glu Glu 415	AGG GTG GTG CCT AGG GAG Arg Val Val Pro Arg Glu 420	1302
GAA GTA GCG GAG AGG Glu Val Ala Glu Arg 425	CTG AGA GAA GTT ACG Leu Arg Glu Val Thr 430	AAA GGA GAG AAA GCG ACG Lys Gly Glu Lys Ala Thr 435	1350
GAG CTG AAG AAG AAT Glu Leu Lys Lys Asn 440	GCT TTA AAA TGG AAG Ala Leu Lys Trp Lys 445	GAG GAG GCG GAA GCG GCC Glu Glu Ala Glu Ala Ala 450	1398
GTG GCT CGC GGT GGT Val Ala Arg Gly Gly 455	TCG TCG GAT CGG AAT Ser Ser Asp Arg Asn 460	CTT GAT GAG TTT GTG GAA Leu Asp Glu Phe Val Glu 465	1446
AAG TTG GGC GTG AAA Lys Leu Gly Val Lys 470	CCT GTG GCT AAA CAG Pro Val Ala Lys Gln 475	AAC GGA AGT CTC AAT CAA Asn Gly Ser Leu Asn Gln 480	1494 485
AAC GGA AGT ATT CAA Asn Gly Ser Ile Gln 490	AAA CTT TTA TTG CAA Lys Leu Leu Leu Gln 495	AAG TCA TAA ATGTGTTTGT Lys Ser *	1543
TATTATCTGT TGTTTGTTTT	CTGCAAATCC TGATAATTGT	GTTTGTTTGT ATGCTCCCTC	1603
CGTTCTTTGT TCTCGTTTTT	TTTTTGATATG GGTTCGGGGA	GACTAGTTAT CCTTCTTGAA	1663
TAAATGTTAG ATCACGACTT	GTGTTCTTAA GATTAAAAAA	AAAAAAAAAA AA	1715

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 498 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

Met Glu Leu Ser Ser Ser Pro Leu Pro Pro His Val Met Leu Val Ser
 1             5             10             15

Phe Pro Gly Gln Gly His Val Asn Pro Leu Leu Arg Leu Gly Lys Leu
      20             25             30

Leu Ala Ser Lys Gly Leu Leu Val Thr Phe Val Thr Thr Glu Ser Trp
      35             40             45

Gly Lys Lys Met Arg Thr Ala Asn Lys Ile Gln Asp Arg Ala Leu Lys
      50             55             60

Pro Ile Gly Lys Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Phe Phe Asn Asp Gly Leu
      65             70             75             80

Pro Glu Asp Asp Asp Ala Ser Arg Thr Asn Leu Thr Ile Leu Arg Pro
      85             90             95

Gln Leu Glu Leu Val Gly Gln Gln Glu Ile Lys Asn Leu Val Lys Arg
      100            105            110

Tyr Lys Glu Val Met Lys Gln Pro Val Thr Cys Leu Ile Asn Asn Pro
      115            120            125

Phe Val Ser Trp Val Cys Asp Val Ala Glu Asp Leu Gln Ile Pro Cys
      130            135            140

Ala Val Leu Trp Val Gln Ser Cys Ala Cys Leu Ala Ser Tyr Tyr Tyr
      145            150            155            160

Tyr Asn His Lys Leu Val Asp Phe Pro Thr Glu Thr Asp Pro Lys Ile
      165            170            175

Asp Val Gln Ile Pro Cys Met Pro Val Leu Lys His Asp Glu Ile Pro
      180            185            190

Ser Phe Ile His Pro Phe Ser Pro Tyr Ser Gly Leu Arg Glu Val Ile
      195            200            205

Ile Asp Gln Ile Lys Arg Leu His Lys Pro Phe Ala Val Leu Ile Asp
      210            215            220

Thr Phe Tyr Ser Leu Glu Lys Asp Ile Ile Asp His Met Thr Asn Leu
      225            230            235            240

Ser Arg Thr Gly Phe Val Arg Pro Leu Gly Pro Leu Tyr Lys Met Ala
      245            250            255

Lys Thr Leu Ile Cys Asp-Asp Ile Lys Gly Asp Met Ser Glu Thr Arg
      260            265            270

Asp Asp Cys Met Glu Trp Leu Asp Ser Gln Pro Val Ser Ser Val Val

```

275	280	285
Tyr Ile Ser Phe Gly Thr Val Ala Tyr Val Thr Gln Glu Gln Ile Ser		
290	295	300
Glu Ile Ala Leu Gly Val Leu Asn Ala Asp Val Ser Phe Leu Trp Val		
305	310	315 320
Ile Arg Gln Gln Glu Leu Gly Val Asn Lys Glu Arg His Val Leu Pro		
	325 330	335
Glu Glu Leu Lys Gly Lys Gly Lys Val Ile Glu Trp Cys Ser Gln Glu		
	340 345	350
Lys Val Leu Ala His Pro Ser Val Val Cys Phe Val Thr His Cys Gly		
	355 360	365
Trp Asn Ser Thr Met Glu Ala Leu Ser Ser Gly Val Pro Thr Val Cys		
	370 375	380
Phe Pro Gln Trp Gly Asp Gln Val Thr Asp Ala Ala Tyr Met Ile Asp		
385	390	395 400
Val Phe Lys Thr Gly Val Arg Leu Ser Arg Gly Glu Thr Glu Glu Arg		
	405 410	415
Val Val Pro Arg Glu Glu Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu Val Thr Lys		
	420 425	430
Gly Glu Lys Ala Thr Glu Leu Lys Lys Asn Ala Leu Lys Trp Lys Glu		
	435 440	445
Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala Arg Gly Gly Ser Ser Asp Arg Asn Leu		
	450 455	460
Asp Glu Phe Val Glu Lys Leu Gly Val Lys Pro Val Ala Lys Gln Asn		
465	470 475	480
Gly Ser Leu Asn Gln Asn Gly Ser Ile Gln Lys Leu Leu Leu Gln Lys		
	485 490	495

Ser *